



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI

CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

**PREDIÇÃO DA SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DE
MOLÉCULAS NATURAIS UTILIZANDO FERRAMENTA QSAR**

Guilherme Schwingel Henn

Lajeado, novembro de 2019

Guilherme Schwingel Henn

PREDIÇÃO DA SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DE MOLÉCULAS NATURAIS UTILIZANDO FERRAMENTA QSAR

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso de graduação, Bacharelado em Química Industrial, da Universidade do Vale do Taquari, como parte da exigência para a obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Eduardo Miranda Ethur

Lajeado, novembro de 2019

RESUMO

Historicamente, os produtos naturais têm sido usados pela sociedade para os mais diversos fins, sendo uma das mais promissoras fontes de novos fármacos. Os óleos essenciais, oriundos das vias metabólicas secundárias das plantas, constituem uma das classes mais estudadas de moléculas orgânicas naturais. Ensaio *in silico* surge como uma alternativa para acelerar a pesquisa de novos compostos bioativos, quer seja indicando potencialidades como alertando para possíveis toxicidades. Ferramentas como *Danish (Q)SAR Database* realizam uma modelagem de moléculas para a avaliação das propriedades de moléculas químicas. Este trabalho tem como objetivo a utilização da ferramenta *in silico Danish (Q)SAR Database* na predição da segurança farmacológica de componentes majoritários de óleos essenciais, baseando-se na avaliação das propriedades de maior relevância e consistência fornecidas pelos laudos.

Palavras-chave: *in silico*; (Q)SAR; compostos naturais; óleo essencial; farmacologia.

SUMÁRIO

RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Objetivo geral	6
1.1.1 Objetivos específicos	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Avaliação <i>in silico</i>	7
2.2 Relação quantitativa de estrutura-atividade – QSAR (quantitative structure-activity relationship)	8
2.3 Compostos naturais	10
2.4 Metabólitos Secundários	11
2.5 Óleos essenciais	11
3. METODOLOGIA	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 1,8-cineol	16
4.2 Limoneno	18
4.3 α -pineno	20
4.4 Pulegona	23
4.5 (E)-nerolidol	27
5. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

Com a impossibilidade de testar todos os compostos químicos e farmacêuticos existentes no ambiente em uma grande quantidade de *endpoints*, se faz necessário a realização de ensaios *in silico* como QSAR para modelagem de moléculas para a avaliação de risco de compostos químicos. Uma vez que os produtos farmacêuticos podem ser perigosos e causar impacto severo na saúde humana e no meio ambiente, sendo encontrados resíduos de disruptores endócrinos em corpos superficiais de água, efluentes de estações de tratamento de esgoto e estações de tratamento de água potável, a análise da presença de fármacos é de grande importância (KHAN, 2019).

O *Danish (Q)SAR Database* (relação quantitativa de estrutura-atividade) é uma ferramenta que correlaciona as propriedades químicas das moléculas usando vários parâmetros quantitativos, obtidos computacional ou experimentalmente. Utilizando em pesquisa, essa ferramenta pode nos fornecer uma previsão das propriedades de compostos químicos não testados e/ou novos, podendo explicar seus efeitos em relação às suas estruturas e propriedades, permitindo-nos identificar as características que contribuem para a atividade biológica e toxicidade das moléculas estudadas (ROY, 2015).

A utilização de análises *in silico* se torna uma alternativa para estudos preliminares, pois as barreiras regulatórias aparentam estar negando melhorias de preço-desempenho em muitos setores industriais. Na indústria farmacêutica, esse paradoxo foi chamado de "Lei de Eroom" onde se argumenta:

A eficiência em P & D, medida simplesmente em termos do número de novos medicamentos trazidos ao mercado pelas indústrias globais de

biotecnologia e farmacêutica por bilhão de dólares em gastos com P & D, declinou de forma razoavelmente constante (SCANNELL, 2012, p.191).

Isto parece estar ocorrendo em outros setores como a biotecnologia agrícola, que parece estar ligado à obstáculos regulatórios e sendo moldada por campanhas de organizações não governamentais (ONGs) (HALL, 2016).

Os produtos naturais têm sido usados pela sociedade por muitos anos em alimentos, cosméticos, venenos para caça, medicamentos e agentes de proteção de cultivos, onde se extraía os compostos de uma fonte e utilizava-o como uma mistura impura. Com os avanços na pesquisa e desenvolvendo na ciência, a utilização de produtos naturais avançou significativamente nos últimos tempos, levando a um refinamento dos compostos e produtos (COPPING, 2007).

São notáveis as vantagens dos produtos de origem natural como fonte de agentes de processos fisiológicos, e espera-se que químicos consigam proporcionar o avanço na busca de novos agentes na descoberta medicinal, tendo como fonte produtos naturais (NEWMAN, 2012). Tem-se como melhor solução para a crise de produtividade na descoberta e desenvolvimento de drogas envolvendo a comunidade científica a realização de uma abordagem multidisciplinar, que envolve a diversidade molecular encontrada a partir de fontes de produtos naturais, junto de metodologias sintéticas combinatórias e a manipulação de vias biossintéticas (NEWMAN, 2016).

Os óleos essenciais normalmente são misturas complexas produzidas por meio das vias metabólicas secundárias das plantas, possuindo geralmente dois ou três compostos majoritários, que podem ser classificados em dois grandes grupos químicos, terpenos e fenilpropanóides (SMITH, 2018).

1.1 Objetivo geral

O trabalho teve por objetivo geral a utilização da ferramenta *in silico Danish (Q)SAR Database* na predição da segurança farmacológica de componentes majoritários de óleos essenciais, baseando-se na avaliação das propriedades de maior relevância e consistência fornecidas pelos laudos.

1.1.1 Objetivos específicos

- Realizar uma varredura de todos os parâmetros fornecidos pela ferramenta para os constituintes majoritários de um óleo essencial;
- Avaliar os principais parâmetros de interesse farmacológico que se destacaram da análise;
- Avaliar os resultados fornecidos pelo laudo para predizer a segurança farmacológica sobre os compostos analisados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avaliação *in silico*

Análises *in silico* vem se tornando cada vez mais importantes na área da toxicologia devido aos avanços no poder computacional junto de interfaces de fácil compreensão e ao aumento da acessibilidade de dados para gerar previsões, reduzindo custo e tempo de análise, auxiliando também na regulamentação e registro de compostos químicos, possuindo a grande vantagem de realizar a previsão da toxicidade antes mesmo da síntese. (CHERKASOV, 2014; PARTHASARATHI, 2018).

A indústria cosmecêutica tem uma grande motivação para usar abordagens *in silico*, pois oferecem benefícios tais como seleção altamente eficaz de banco de dados químicos sem a necessidade de testes físicos, realizando assim, uma melhor seleção de candidatos antes da síntese das moléculas, reduzindo o tempo e o custo do processo. Desta forma, permite um uso melhor dos dados já existentes e ainda na redução e substituição do uso de análises (GELLATLY, 2019).

A aplicação de ferramentas *in silico* para a avaliação da genotoxicidade, especialmente quando as informações são limitadas sobre as impurezas, é a chave para minimizar o risco de complicações de medicamentos em fases posteriores do processo de desenvolvimento de fármacos. Baseando-se em relações de estrutura-atividade tem-se a capacidade de prever o resultado do teste de Ames, sendo este um ensaio biológico que utiliza bactérias para testar

se um determinado composto químico possui potencial mutagênico afetando o DNA do organismo de teste, resultando em uma otimização na análise de compostos candidatos a medicamentos (WICHARD, 2017).

2.2 Relação quantitativa de estrutura-atividade – QSAR (quantitative structure-activity relationship)

O funcionamento da ferramenta *Danish (Q)SAR Database* baseia-se na identificação de atributos estruturais e/ou propriedades físico-químicas associadas à sua atividade, e utiliza dessas informações para criar uma previsão para uma molécula não estudada. Estes modelos de previsões oferecem o risco potencial de novos candidatos a formulações de produtos no início do desenvolvimento, não havendo a necessidade de síntese química e fornecendo suporte para a regularização de uma substância (HSU, 2018). As propriedades avaliadas nas moléculas são chamadas *endpoints*, tais como toxicidade aguda, carcinogenicidade, mutagenicidade e apoptose (HANSCH, 2007).

Vem sendo amplamente explorada a pesquisa em desenvolvimento de métodos alternativos (não animais) para prever toxicidade em mamíferos visando a substituição e redução do uso de animais em ensaios. Modelos de previsão como QSAR, além da fácil aplicação e eficiência em termos de tempo e custo financeiro, contribuem para a compreensão do mecanismo da atividade biológica que estão sendo modelados (LESSIGIARSKA, 2006).

Dentre os estudos realizados pela ferramenta *Danish (Q)SAR Database*, tem-se a determinação da ação de compostos industriais. Essas análises sobre o comportamento físico-químico e biológico das moléculas a serem estudadas tratam, por exemplo, de reatividade, biodegradação e de toxicidade (ARGESE, 2005; TODESCHINI, 1996) e mutagenicidade dos compostos primários e as impurezas da substância (STAVITSKAYA, 2015). Esses ensaios são pertinentes, pois, na maioria dos casos, são mais rápidas, baratas e

reprodutíveis, comparando com ensaios *in vitro* e permitem um amplo acúmulo de dados em uma variedade produtos químicos (GUSTAVSON, 1998).

Os modelos preditivos de QSAR vêm recebendo muitas atenções na área ambiental. Vários estudos foram realizados para prever as constantes de velocidade de reação em processos de oxidação avançada, onde algumas relações universais foram desenvolvidas para interpretar a degradação de compostos orgânicos. Como as constantes da taxa de reação determinadas por métodos experimentais ainda são limitadas comparando ao número crescente de poluentes orgânicos que entram no ambiente, estão sendo aplicados em larga escala modelos de QSAR para prever as constantes de velocidade de oxidação (CHENG, 2018).

Metodologias utilizando ferramentais computacionais surgiram como alternativas economicamente viáveis quando comprado aos métodos convencionas de “tentativa e erro” para compreender as propriedades farmacofóricas visando a simplificação da análise de fármacos. Métodos de previsão de QSAR podem ser utilizados em conjunto com abordagens de encaixe molecular, modelagem de farmacóforo, simulações de dinâmica molecular, com o intuito de fornecer informações eficazes para a otimização do estudo. Estes métodos fornecem um entendimento completo das propriedades farmacofóricas associadas à atividade específica e toxicidade de um candidato a medicamento (MASAND, 2019).

Tendo compostos naturais como candidatos com alto potencial para medicamentos e, a similaridade estrutural de certos compostos naturais com metabólitos encontrados no corpo humano tornando o metabolismo um fator crítico na determinação da eficácia de medicamentos naturais, os modelos baseados em QSAR são comumente usados na etapa de otimização da descoberta de fármacos para avaliar várias propriedades, em particular a toxicidade, minimizando assim o tempo, custo e trabalho (KAZMI, 2019).

2.3 Compostos naturais

Tem-se encontrado uma vasta gama de aplicações industriais das substâncias oriundas de compostos naturais, tais como farmacêutica e terapêutica (DHAR, 2017), cosmética e alimentícia (CARDARELLI, 2017; JAVED, 2014), e no controle sustentável de pragas agrícolas (D'ADDABBO, 2017; RAMZI, 2017).

Com o intuito de obter um substituto para compostos sintéticos, indústrias estão avaliando com cada vez mais afinco a utilização de compostos naturais com propriedades biocidas em suas formulações, para o controle sustentável de pragas agrícolas, podendo exercer a função de nematicida (D'ADDABBO, 2017).

Segundo Simões (2002), no Brasil vêm sendo realizadas inúmeras pesquisas em instituições de ensino superior desde os anos 80 para a avaliação das propriedades e aplicação da vasta e variada flora nas áreas de química, agronomia e farmacologia.

Pesquisadores têm voltado sua atenção e pesquisa para o aumento da produção de alimentos que se faz necessário pela rápida expansão da população mundial. Porém, perdas significativas na produção vêm ocorrendo devido a pragas e doenças causadas por fungos e bactérias (KORDALI, 2015). Visando a proteção da sua plantação e produtos, agricultores vêm usando grandes quantidades de herbicidas, entretanto, o uso contínuo de herbicidas sintéticos resulta na contaminação do solo e das águas subterrâneas, aumenta o risco de resíduos tóxicos em alimentos, além de fazer com que as ervas daninhas desenvolva resistência aos compostos dos produtos (DUKE, 2000).

2.4 Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários presente nas plantas são classificados como compostos essenciais para a adaptação e defesa das plantas, não possuindo papel significativo nos processos vitais (JAMWAL, 2018; WANG, 2018).

Um variado conjunto de metabólitos secundários é sintetizado pelas plantas, como alcaloides, flavonoides, quinonas e terpenóides, que, por meio de pesquisas, encontraram-se utilizações como fármacos, agroquímicos, fragrâncias, biopesticidas e aditivos alimentares (THAKUR, 2018).

Terpenos geralmente são oleosos, de odor desagradável e tóxico, essas propriedades possuem o objetivo de atrair animais dispersantes de sementes e pólen, defender plantas contra insetos herbívoros e afetar o crescimento de plantas concorrentes (CAPDESUÑER, 2019).

Alguns compostos do grupo de polifenóis possuem propriedades neuroprotetoras, resultante de sua capacidade de influenciar e modular processos celulares implicados na neurodegeneração, função essa encontrada nos compostos da classe de flavonoide encontrado e grande quantidade em alimentos (SPAGNUOLO, 2018).

2.5 Óleos essenciais

Óleos essenciais são obtidos por destilação a vapor das folhas das plantas (ISMAN, 2006), sendo constituída de uma mistura complexa de compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos, terpenos, fenóis e aldeídos extraídos de plantas, sendo a composição da mistura variada de cada planta (OSMAN, 2017).

Os componentes majoritários dos óleos essenciais podem ser estudados para serem aproveitados como ferramentas de grande valor para o controle de pragas na agricultura (DAYAN, 2009; FAGODIA, 2017), pois suas propriedades

não causam efeitos prejudiciais ao ambiente e são, em sua maioria, consideradas substâncias químicas seguras (BATISH, 2008; TWORKOSKI, 2002).

Com o uso frequente de pesticidas nas plantações, resíduos podem ser frequentemente encontrados em alimentos, corpos de água, solo e ar (VILLAYERDE, 2016). Com isso, óleos essenciais vêm se tornando uma interessante alternativa de substituição aos pesticidas sintéticos, pois seus efeitos são menos impactantes negativamente sobre a saúde e ao meio ambiente (XIE, 2017).

Óleos essenciais são vistos como boas opções de substituição aos pesticidas sintéticos por apresentarem variada bioatividade, como atividade inseticida, repelente, impedimento de oviposição de insetos e outras pragas (TAK, 2017). Além disso, geralmente são considerados mais seguros do que muitos pesticidas sintéticos, apresentando mínima persistência no ambiente e toxicidade para humanos e mamíferos (ISMAN, 2006).

3. METODOLOGIA

O presente estudo buscou realizar a predição da segurança farmacológica de componentes majoritários de óleos essenciais de *Psidium salutare* var. *sericeum*, *Hesperozygis ringens* e *Campomanesia aurea* utilizando a fermenta *Danish* (Q)SAR Database.

Os óleos essenciais estudados foram cedidos pelo grupo de pesquisa do projeto “Estudo etnobotânico, químico e atividade biológica de plantas brasileiras”.

A avaliação foi realizada nos compostos majoritários de cada óleo. Uma vez que são os compostos majoritários, individual ou conjuntamente, que caracteriza a atividade biológica do óleo.

O laudo de predição foi gerado pela base de dados dinamarquesa *Danish* (Q)SAR Database disponível no site <http://qsar.food.dtu.dk/>. A busca do composto pela ferramenta pode ser feita pelo desenho da estrutura ou pelo seu nome em inglês.

As propriedades avaliadas foram voltadas para a ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) da saúde humana como irritação e sensibilização, parâmetros endócrinos e moleculares, genotoxicidade e carcinogenicidade.

Os resultados foram fornecidos pelos bancos de dados Battery, CASE Ultra, Leadscape e SciQSAR, fornecendo a avaliação como inconclusivo (INC), quando a avaliação não pôde ser feita, negativo (NEG) e positivo (POS), e nos

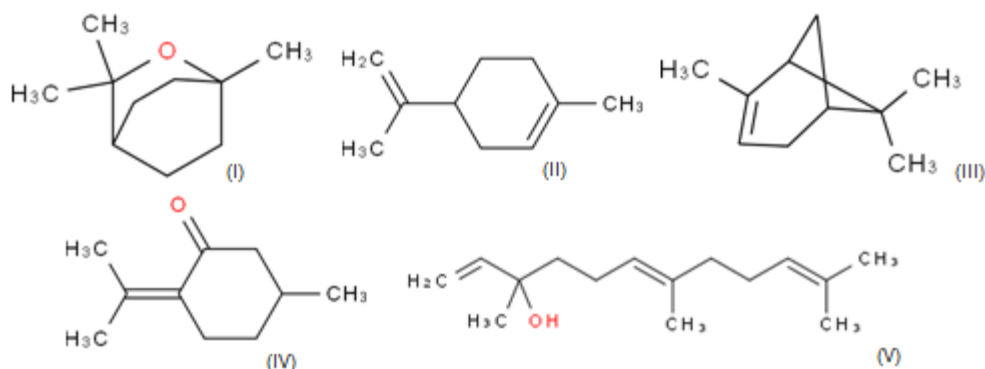
informando também se a avaliação está dentro do domínio de aplicabilidade (IN) ou fora do domínio de aplicabilidade (OUT).

Com o laudo gerado, foi feita a seleção e avaliação das propriedades conforme o seu destaque dentre as demais e nos resultados que apresentaram maior concordância entre os bancos de dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos analisados pela ferramenta *Danish (Q)SAR Database* foram o 1,8-cineol (Figura 1), o limoneno (Figura 2) e o α -pineno (Figura 3), compondo 30%, 6% e 6% do óleo de *Psidium salutare* var. *sericeum* respectivamente; a pulegona (Figura 4), constituindo 80% dos componentes do óleo de *Hesperozygis ringens* e o (E)-nerolidol (Figura 5) compondo 50% do óleo de *Campomanesia aurea*. Foram avaliados os laudos preditivos dos componentes, destacando os parâmetros que apresentaram os resultados mais consistentes.

Figura 1 – Estruturas químicas do 1,8-cineol (I), limoneno (II), α -pineno (III), pulegona (IV) e (E)-nerolidol (V).



4.1 1,8-cineol

Os resultados obtidos pela ferramenta *Danish (Q)SAR Database*, para o 1,8-cineol, estão dispostos no Quadro 1 onde, para a avaliação de irritação e sensibilização, os parâmetros “Dermatite de contato alérgica” e “Sensibilização respiratória” apresentaram resultados negativos, indicando que o composto não causará irritação respiratória quando inalado, e dérmica quando em contato.

Abrangendo os *endpoints* endócrinos e moleculares, obteve-se resultados negativos para o ensaio “Ligação ao receptor pregnano X”, indicando que o 1,8-cineol provavelmente não apresentará efeito sobre a desregulação endocrinológica neste fator testado.

A avaliação da genotoxicidade do 1,8-cineol gerada pela ferramenta especialista apresentou negativo para os “Alertas estruturais de Ashby”, indicando que, com base na estrutura do composto, este composto não causará danos ao DNA, o qual é complementado com os resultados negativos dos ensaios de “Aberrações cromossômicas em células de ovário”, “Síntese de DNA não programada em hepatócitos”, “Transformação de células embrionárias” e “Teste letal recessivo relacionado ao sexo”, sendo assim, não apresentando caráter genotóxico. A análise de mutagenicidade “Teste de Ames” apresentou resultado negativo, indicando que o composto não é mutagênico.

Para a predição de carcinogenicidade, os testes “Câncer em rato fêmea”, “Câncer em rato”, “Câncer em camundongo macho” e “Câncer em roedores” apresentaram 50% dos resultados negativos juntamente do ensaio de “Câncer específico de fígado em ratos ou camundongos” que resultou em negativo, porém, obteve-se 50% dos resultados positivo para o teste “Câncer em camundongo fêmea”, sendo assim, é provável que o composto apresente algum dano celular apenas para alguns organismos específicos, não interferindo nos demais como indica a predição, mas necessitando de uma avaliação mais profunda para resultados.

Quadro 1 – Saídas do *Danish (Q)SAR Database* para o 1,8-cineol.

		Battery	CASE Ultra	Leadscope	SciQSAR
Irritação e Sensibilização	Dermatite de contato alérgica em porquinhos da índia e humanos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Sensibilização respiratória em humanos	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
Endpoints endócrinos e moleculares	Ligação ao Receptor Pregnano X (humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Genotoxicidade	Alertas estruturais de Ashby para reatividade ao DNA	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vitro</i>	Aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Síntese de DNA não programada em hepatócitos de ratos	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
	Transformação de células do embrião de hamster sírio	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vivo</i>	Teste letal recessivo ligado ao sexo em <i>Drosophila m.</i>	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Teste de mutação reversa bacteriana	Teste de Ames em <i>S. typhimurium</i> (<i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN

Carcinogenicidade	Câncer em ratos fêmeas	-	NEG_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em ratos	-	NEG_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em camundongos machos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos fêmeas	-	POS_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em roedores	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer específico do fígado em ratos ou camundongos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN

Fonte: Do autor.

4.2 Limoneno

No Quadro 2 estão os resultados preditivos do webserver *Danish (Q)SAR Database* referentes ao limoneno onde a avaliação de irritação e sensibilização, resultou em negativo para “Dermatite de contato alérgica” e “Sensibilização respiratória”, dando indícios de que o composto não causará irritação respiratória e dérmica.

Para os *endpoints* endócrinos e moleculares, no ensaio preditivo de “Antagonismo do receptor andrógeno”, o resultado foi negativo indicando que o composto é seguro para o fator avaliado.

A análise da estrutura da molécula pelos “Alertas estruturais de Ashby”, para genotoxicidade, resultou em negativo, assim como nos ensaios de “Aberrações cromossômicas em células de ovário”, “Mutações no locus HGPRT em células de ovário”, “Transformação de células do embrião”, “Teste letal recessivo ligado ao sexo” e no “Ensaio cometa”. Com isso, pode-se prever que o limoneno não possui ação genotóxica prejudicial sobre as células referentes a estes ensaios.

O “Teste de Ames”, o qual compõe o teste de mutação reversa bacteriana, gerou um resultado negativo, indicando que o composto não possui potencial mutagênico.

Os resultados apresentados para o fator carcinogênico são indicativos de segurança do composto, tendo em vista que o *Danish (Q)SAR Database* indicou pelo menos 50% dos *endpoints* com risco de carcinogenicidade negativo.

Quadro 2 – Saídas do *Danish (Q)SAR Database* para o limoneno.

		Battery	CASE Ultra	Leadscope	SciQSAR
Irritação e Sensibilização	Dermatite de contato alérgica em porquinhos da índia e humanos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Sensibilização respiratória em humanos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints endócrinos e moleculares	Antagonismo do Receptor Andrógeno (Humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Genotoxicidade	Alertas Estruturais de Ashby para Reatividade de DNA	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vitro</i>	Aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Mutações no locus HGPRT em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN	NEG_IN

	Transformação de células do embrião de hamster sírio	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vivo</i>	Teste letal recessivo ligado ao sexo em <i>Drosophila m.</i>	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
	Ensaio cometa em camundongos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Teste de mutação reversa bacteriana	Teste de Ames em <i>S. typhimurium</i> (<i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Carcinogenicidade	Câncer em ratos fêmeas	-	NEG_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em camundongos machos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos fêmea	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em roedores	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer específico do fígado em ratos ou camundongos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN

Fonte: Do autor.

4.3 α -pineno

O Quadro 3 apresenta os resultados preditivos obtidos pelo *Danish (Q)SAR Database* para o α -pineno onde o ensaio de “Sensibilização

respiratória” resulta em negativo, não apresentando irritação prejudicial por inalação.

Os ensaios de “Ligação ao receptor de estrogênio α ”, “Ativação do receptor de estrogênio α ” e “Antagonismo do receptor andrógeno”, apresentaram predições negativas, indicando que o composto não tem influência sobre os hormônios testados nestes ensaios.

Os parâmetros avaliados para genotoxicidade, sendo eles “Alertas estruturais de Ashby”, “Aberrações cromossômicas em células de ovário”, “Aberrações cromossômicas em células de pulmão”, “Mutações no locus HGPRT em células de ovário”, “Síntese de DNA não programada em hepatócitos”, “Teste letal recessivo ligado ao sexo” e “Ensaio cometa”, apresentaram resultados negativos indicando que não há ação danosa às células referente aos testes disponíveis.

O “Teste de Ames” resultou em negativo, fazendo com que o composto não tenha potencial mutagênico. A predição para “Câncer específico de fígado em ratos ou camundongos” apresentou variabilidade, com propensão para o negativo, mas não sendo possível uma avaliação final. O teste mutação reversa bacteriana, indicando que o composto não tem potencial mutagênico.

Todos os *endpoints* relacionados a carcinogenicidade resultaram em 50% dos resultados negativos, com exceção do ensaio “Câncer específico de fígado” onde mostra 25% dos resultados negativos, onde, mesmo sendo uma baixa percentagem, indica uma propensão preditiva ao negativo.

Quadro 3 – Saídas do *Danish (Q)SAR Database* para o α -pineno.

		Battery	CASE Ultra	Leadscope	SciQSAR
Irritação e Sensibilização	Sensibilização respiratória em humanos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN
Endpoints endócrinos e moleculares	Ligação ao receptor de estrogênio α , conjunto completo de treinamento (humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN

	Ativação do Receptor de Estrogênio α (Humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Antagonismo do Receptor Andrógeno (Humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Genotoxicidade	Alertas Estruturais de Ashby para Reatividade de DNA	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vitro</i>	Aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Aberrações cromossômicas em células de pulmão de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT
	Mutações no locus HGPRT em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN	NEG_IN
	Síntese de DNA não programada em hepatócitos de ratos	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vivo</i>	Teste letal recessivo ligado ao sexo em <i>Drosophila m.</i>	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
	Ensaio cometa em camundongos	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN	NEG_IN

Teste de mutação reversa bacteriana	Teste de Ames em <i>S. typhimurium</i> (<i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Carcinogenicidade	Câncer em ratos machos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em ratos fêmeas	-	NEG_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em ratos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos machos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos fêmeas	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em roedores	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer específico do fígado em ratos ou camundongos	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_OUT	INC_OUT

Fonte: Do autor.

4.4 Pulegona

Analisando o laudo de predição do *Danish (Q)SAR Database* para o composto pulegona (Quadro 4), dentro do fator irritação e sensibilização, apresentou avaliação negativa para os atributos “Dermatite de contato alérgica” e “Sensibilização respiratória”, indicando a ausência de interação prejudicial.

Para os fatores endócrinos e moleculares a predição da ferramenta apresentou resultados negativos para “Ligação ao receptor de estrogênio”, “Ativação do receptor de estrogênio” e “Antagonismo do receptor andrógeno”, sendo assim, tem-se que este composto não apresentará efeito sobre a desregulação endocrinológica devido aos indicadores apresentados.

Para os *endpoints* de genotoxicidade *in vitro*, obtidos pelo sistema especialista DTU, a predição resultou em 75% negativo para “Aberrações cromossômicas em células pulmonares” e “Mutações no locus HGPRT em células de ovário”, entretanto, apresentou positivo em 75% dos resultados para a avaliação de “Transformação de células embrionárias”. Nos *endpoints* de genotoxicidade *in vivo* a análise resultou em negativo para “Teste letal recessivo relacionado ao sexo” e 75% dos resultados negativos para os ensaios “Teste de micronúcleos em eritrócitos”, “Mutações letais dominantes” e “Ensaio cometa”. Estes resultados, junto da avaliação negativa de “Alertas estruturais de Ashby”, indicam que há uma possibilidade de que o composto pode causar alterações genéticas em células embrionárias específicas, podendo causar danos mutagênicos.

Para a análise de potencial mutagênico o “Teste de Ames em *S. typhimurium*”, indicou 75% dos resultados negativos, indicando que o composto é possivelmente não mutagênico.

A avaliação de carcinogenicidade foi 50% negativa para “Câncer em rato macho” e 75% negativa para “Câncer específico de fígado em ratos ou camundongos”, porém resultou em 50% dos resultados em positivo para “Câncer em rato fêmea”, “Câncer em camundongo macho”, “Câncer em camundongo fêmea”, “Câncer em camundongo” e “Câncer em roedores”. O resultado apresentado é um indicativo de possível de risco de carcinogenicidade, tendo em vista o resultado dos testes que conferem com o relatório técnico do National Toxicology Program (2011) sobre o composto pulegona, onde é salientado que houve nítida evidência de atividade carcinogênica em ratos fêmeas baseando-se no aumento da incidência de neoplasias na bexiga, bem como a atividade carcinogênica em camundongos machos e fêmeas a partir do aumento da incidência de neoplasias hepatocelulares.

Quadro 4 – Saídas do *Danish (Q)SAR Database* para o pulegona.

		Battery	CASE Ultra	Leadscope	SciQSAR
Irritação e Sensibilização	Dermatite de contato alérgica em porquinhos da índia e humanos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Sensibilização respiratória em humanos	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
Endpoints endócrinos e moleculares	Ligação ao receptor de estrogênio α , (humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
	Ativação do Receptor de Estrogênio α (humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Antagonismo do Receptor Andrógeno (humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Genotoxicidade	Alertas Estruturais de Ashby para Reatividade de DNA	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vitro</i>	Aberrações cromossômicas em células de pulmão de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
	Mutações no locus HGPRT em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	INC_OUT	NEG_IN
	Transformação de células do embrião de hamster sírio	POS_IN	INC_OUT	POS_IN	POS_IN

Endpoints genotóxicos <i>in vivo</i>	Teste letal recessivo ligado ao sexo em <i>Drosophila m.</i>	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Teste de micronúcleos em eritrócitos de camundongo	NEG_IN	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN
	Mutações letais dominantes em roedores	NEG_IN	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN
Teste de mutação reversa bacteriana	Teste de Ames em <i>S. typhimurium</i> (<i>in vitro</i>)	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Carcinogenicidade	Câncer em ratos machos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em ratos fêmeas	-	POS_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em camundongos machos	-	POS_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em camundongos fêmeas	-	POS_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em camundongos	-	POS_IN	NEG_OUT	-
	Câncer em roedores	-	POS_IN	NEG_OUT	-
	Câncer específico do fígado em ratos ou camundongos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN

Fonte: Do autor.

4.5 (E)-nerolidol

Dispostos no Quadro 5, estão os resultados obtidos pelo *Danish (Q)SAR Database* referentes ao (E)-nerolidol. Para os *endpoints* “Dermatite de contato alérgica” e “Sensibilização respiratória”, relacionados à irritação e sensibilização, obteve-se 100% e 75% dos resultados negativos respectivamente. Entretanto, a predição gerou 75% de resultados positivos para “Irritação severa de pele”, o que indica que o composto possa ter alguma reação quando em contato dérmico.

Os *endpoints* endócrinos e moleculares resultaram em predição negativa para “Antagonismo do receptor andrógeno” e 75% de resultados positivos para o ensaio “Ligação ao receptor de Pregnano X”, indicando que o composto pode ser um desregulador hormonal agindo no metabolismo dos esteroides por exemplo.

A avaliação preditiva para genotoxicidade resultou em 75% dos resultados negativos para os parâmetros “Mutações no locus HGPRT em células de ovário”, “Transformação de células embrionárias”, “Teste letal recessivo relacionado ao sexo” e 100% de resultados negativos para “Aberrações cromossômicas em células pulmonares” e “Teste de micronúcleos em eritrócitos”, bem como no “Teste de Ames” para potencial mutagênico. Contudo, a predição apresentou 25% de resultados positivos para “Mutações letais dominantes”, por ser um resultado de baixo valor, pode-se comparar com o resultado do “Teste de Ames” que gerou um teste negativo, indicando que o composto não possui potencial mutagênico.

Os resultados gerados para a avaliação preditiva de carcinogenicidade são indicativos de segurança do composto, tendo em vista que o a ferramenta *Danish QSAR Database* indicou todos os *endpoints* com pelo menos 50% dos resultados negativo, sendo assim, não possuindo potencial carcinogênico.

Quadro 5 – Saídas do *Danish (Q)SAR Database* para o (E)-nerolidol.

		Battery	CASE Ultra	Leadscope	SciQSAR
Irritação e Sensibilização	Irritação grave em pele de coelho	POS_IN	POS_IN	POS_IN	NEG_IN
	Dermatite de contato alérgica em porquinhos da índia e humanos	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Sensibilização respiratória em humanos	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints endócrinos e moleculares	Antagonismo do Receptor Andrógeno (humano <i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Ligação ao Receptor Pregnano X (humano <i>in vitro</i>)	POS_IN	POS_IN	POS_IN	INC_OUT
Endpoints genotóxicos <i>in vitro</i>	Aberrações cromossômicas em células de pulmão de hamster chinês	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
	Mutações no locus HGPRT em células de ovário de hamster chinês	NEG_IN	POS_OUT	NEG_IN	NEG_IN
	Transformação de células do embrião de hamster sírio	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
Endpoints genotóxicos <i>in vivo</i>	Teste letal recessivo ligado ao sexo em <i>Drosophila m.</i>	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN
	Teste de micronúcleos em eritrócitos de camundongo	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN

	Mutações letais dominantes em roedores	POS_OUT	POS_OUT	POS_OUT	POS_IN
Teste de mutação reversa bacteriana	Teste de Ames em <i>S. typhimurium</i> (<i>in vitro</i>)	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN	NEG_IN
Carcinogenicidade	Câncer em ratos machos	-	NEG_IN	NEG_IN	-
	Câncer em ratos fêmeas	-	NEG_IN	NEG_IN	-
	Câncer em ratos	-	NEG_IN	NEG_IN	-
	Câncer em camundongos machos	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos fêmeas	-	NEG_IN	INC_OUT	-
	Câncer em camundongos	-	NEG_IN	NEG_IN	-
	Câncer em roedores	-	NEG_IN	NEG_IN	-
	Câncer específico do fígado em ratos ou camundongos	NEG_IN	NEG_OUT	NEG_IN	NEG_IN

Fonte: Do autor.

5. CONCLUSÃO

Com a finalização deste trabalho foi possível perceber que a utilização de ferramentas de análise preditiva *in silico* pode ser uma ferramenta útil na avaliação de moléculas verificando seus potenciais farmacológicos e segurança na saúde. O *Danish (Q)SAR Database* foi utilizado na análise de cinco compostos majoritários de óleos essenciais onde apresentou os compostos limoneno e α -pineno como mais seguros para aplicação, não indicando parâmetros prejudiciais. O composto 1,8-cineol apresentou uma boa segurança com exceção ao ensaio “Câncer em camundongo fêmea”, indicando especificidade de sua ação prejudicial. A avaliação dos compostos pulegona e (E)-nerolidol resultou risco à saúde, pois apresentou ações danosas a organismos indicado pelos *endpoints*, sendo então, os compostos menos seguros e necessitando de um estudo mais aprofundado.

As utilizações de ferramentas *in silico*, mesmo não se mostrando muito visíveis em estudos, apresentam grande potencial, pois, aliado ao baixo custo, nos fornecem uma grande quantidade de informações com muita rapidez, elucidando o panorama geral das possibilidades de ações que os compostos podem apresentar. É válido salientar que as predições são feitas para os compostos individualmente, não sendo possível adquirir informações voltadas ao sinergismo entre moléculas, e tomam como base sua máxima pureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argese, E., Bettiol, C., Marchetto, D., De Vettori, S., Zambon, A., Miana, P., & Ghetti, P. F. (2005). Study on the toxicity of phenolic and phenoxy herbicides using the submitochondrial particle assay. *Toxicology in Vitro*, 19(8), 1035–1043.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166–2174.
- Capdesuñer, Y., García-Brizuela, J., Mock, H. P., Hernández, K. V., de la Torre, M. H., & Santiesteban-Toca, C. E. (2019). Accessing to the *Nicotiana tabacum* leaf antimicrobial activity: In-silico and in-vitro investigations. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Cardarelli, M., Roupshael, Y., Pellizzoni, M., Colla, G., & Lucini, L. (2017). Profile of bioactive secondary metabolites and antioxidant capacity of leaf exudates from eighteen *Aloe* species. *Industrial Crops and Products*, 108, 44–51.
- Cheng, Z., Yang, B., Chen, Q., Tan, Y., Gao, X., Yuan, T., & Shen, Z. (2018). 2D-QSAR and 3D-QSAR simulations for the reaction rate constants of organic compounds in ozone-hydrogen peroxide oxidation. *Chemosphere*.
- Cherkasov, A., Muratov, E. N., Fourches, D., Varnek, A., Baskin, I. I., Cronin, M., ... Tropsha, A. (2014). *QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To?* *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(12), 4977–5010.
- Copping, L. G., & Duke, S. O. (2007). *Natural products that have been used commercially as crop protection agents*. *Pest Management Science*, 63(6), 524–554.
- D'Addabbo, T., Argentieri, M. P., Radicci, V., Grassi, F., & Avato, P. (2017). *Artemisia annua* compounds have potential to manage root-knot and potato cyst nematodes. *Industrial Crops and Products*, 108, 195–200.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4022–4034.
- Dhar, P., Dhar, D. G., Rawat, A. K. S., and Srivastava, S. (2017). Medicinal chemistry and biological potential of *Cyperus rotundus* Linn.: An

overview to discover elite chemotype(s) for industrial use. *Industrial Crops and Products*, 108, 232–247.

Duke, Dayan, Romagni, & Rimando. (2000). *Natural products as sources of herbicides: current status and future trends*. *Weed Research*, 40(1), 99–111.

Fagodia, S. K., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2017). Phytotoxicity and cytotoxicity of *Citrus aurantiifolia* essential oil and its major constituents: Limonene and citral. *Industrial Crops and Products*, 108, 708–715.

Gellatly, N., & Sewell, F. (2019). *Regulatory acceptance of in silico approaches for the safety assessment of cosmetic-related substances*. *Computational Toxicology*.

Gustavson, K.E., Svenson, A., Harkin, J.M., 1998. Comparison of toxicities and mechanism of action of n-alkanols in the submitochondrial particle and the *Vibrio fischeri* bioluminescence (Microtox) bioassay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1917–1921.

Hall, J. (2016). *The Eroom effect (i.e. Moore's Law in reverse): An increasing challenge for new technology development?* *Journal of Engineering and Technology Management*, 40, v–vi.

Hansch, C., & Selassie, C. (2007). Quantitative Structure–Activity Relationship – A Historical Perspective and the Future. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 43–63.

Hsu, C.-W., Hewes, K. P., Stavitskaya, L., & Kruhlak, N. L. (2018). Construction and application of (Q)SAR models to predict chemical-induced in vitro chromosome aberrations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.

Isman, M. B. (2006). *Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 45–66.

Jamwal, K., Bhattacharya, S., & Puri, S. (2018). *Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 26–38.

Javed, S., Atta-Ur, R., 2014. Aloe vera gel in food, health products, and cosmetics industry. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 41, 261–285.

Kazmi, S. R., Jun, R., Yu, M.-S., Jung, C., & Na, D. (2019). *In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review*. *Computers in Biology and Medicine*, 106, 54–64.

Khan, K., Benfenati, E., & Roy, K. (2019). *Consensus QSAR modeling of toxicity of pharmaceuticals to different aquatic organisms: Ranking and prioritization of the DrugBank database compounds*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 287–297.

Kordali, S., Tazegul, A., Cakir, A., 2015. Phytotoxic effects of *Nepeta meyeri* Benth. extracts and essential oil on seed germinations and seedling growths of four weed species. *Rec. Nat. Prod.* 9, 404–418.

Lessigiarska, I., Worth, A. P., Netzeva, T. I., Dearden, J. C., & Cronin, M. T. D. (2006). Quantitative structure–activity–activity and quantitative structure–activity investigations of human and rodent toxicity. *Chemosphere*, 65(10), 1878–1887.

Masand, V. H., El-Sayed, N. N. E., Bambole, M. U., Patil, V. R., & Thakur, S. D. (2019). Multiple quantitative structure-activity relationships (QSARs) analysis for orally active trypanocidal N-myristoyltransferase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1175, 481–487.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). *Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661.

NTP; National Toxicology Program (2011). Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS No. 89–82–7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 563:1–201.

Osman Mohamed Ali, E., Shakil, N. A., Rana, V. S., Sarkar, D. J., Majumder, S., Kaushik, P., ... Kumar, J. (2017). and *Sclerotium rolfsii*. *Industrial Crops and Products*, 108, 379–387.

Parthasarathi, R., & Dhawan, A. (2018). In Silico Approaches for Predictive Toxicology. *In Vitro Toxicology*, 91–109.

Ramzi, H., Ismaili, M. R., Aberchane, M., & Zaanoun, S. (2017). Chemical characterization and acaricidal activity of *Thymus satureioides* C. & B. and *Origanum elongatum* E. & M. (Lamiaceae) essential oils against *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Acari : Varroidae). *Industrial Crops and Products*, 108, 201–207.

Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). Chemical Information and Descriptors. *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, 47–80.

Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H., & Warrington, B. (2012). *Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. Nature Reviews Drug Discovery*, 11(3), 191–200.

Simões, C. M. O., & Schenkel, E. P.. (2002). A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(1), 35-40.

- Smith, G. H., Roberts, J. M., & Pope, T. W. (2018). Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. *Crop Protection*, 110, 125–130.
- Spagnuolo, C., Moccia, S., & Russo, G. L. (2018). Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105–115.
- Stavitskaya, L., et al., 2015. Chemical Structure-Based and Toxicogenomic Models. in: Graziano, M. J., Jacobson-Kram, D., (Eds.), *Genotoxicity and Carcinogenicity Testing of Pharmaceuticals*. Springer International Publishing, Cham, pp. 13-34.
- Tak, J.-H., & Isman, M. B. (2017). *Acaricidal and repellent activity of plant essential oil-derived terpenes and the effect of binary mixtures against Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae)*. *Industrial Crops and Products*, 108, 786–792.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2018). *Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*.
- Todeschini, R., Bettiol, C., Giurin, G., Gramatica, P., Miana, P., Argese, E., 1996. Modeling and prediction by using WHIM descriptors in QSAR studies: submitochondrial particles (SMP) as toxicity biosensors of chlorophenols. *Chemosphere* 33, 71–79.
- Tworokski, T., 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Sci.* 50, 425–431.
- Wang, S., Zheng, Z., Zou, H., Li, N., & Wu, M. (2018). Characterization of the secondary metabolite biosynthetic gene clusters in archaea. *Computational Biology and Chemistry*.
- Wichard, J. D. (2017). In silico prediction of genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 595–599.
- Villaverde, J. J., Sevilla-Morán, B., López-Goti, C., Alonso-Prados, J. L., & Sandín-España, P. (2016). *Trends in analysis of pesticide residues to fulfil the European Regulation (EC) No. 1107/2009*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 568–580.
- Xie, Y., Wang, Z., Huang, Q., & Zhang, D. (2017). Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. *Industrial Crops and Products*, 108, 278–285.